

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

اثر ضد میکروبی اسانس گیاه چای کوهی بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

چکیده

زمینه و هدف: اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی به اثبات رسیده است. گیاه چای کوهی یکی از گیاهان دارویی است که در بسیاری از مناطق ایران به صورت خودرو رشد می یابد. این گیاه جهت درمان برخی از بیماری ها به صورت دم کرده مورد مصرف قرار می گیرد.

روش بررسی: بخش های هوایی گیاه چای کوهی در زمان گل دهی از دامنه های کوه سبلان در اردبیل جمع آوری و با دستگاه کلونجر اسانس روغنی آن جداسازی شد. ترکیبات شیمیایی اسانس به کمک دستگاه GC/MS شناسایی شد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد و باکتری کشی اسانس علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ATCC19118 به روش میکرودايلوشن تعیین شد.

یافته ها: ۱۶ نوع ترکیب شیمیایی در اسانس این گیاه شناسایی شد و α -Myrcene (17/87%)، Phenol (18/16%)، γ -terpinene (28%) و Pinen (12/7%) بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بودند. مقادیر MIC و MBC اسانس برای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۶۰۰ ppm و ۲۴۰۰ ppm تعیین شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که گروه های مونوترپنی و سزکویی ترپنی ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس هستند و این اسانس علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز دارای اثر باکتری کشی می باشد.

واژه های کلیدی: اسانس روغنی، چای کوهی، لیستریا مونوسیتوژنز

حسن محمدپور کنزق

کارشناس ارشد رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی،
دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

مصطفی نوروزی

مرکز تحقیقات رشد کودکان، دانشگاه علوم پزشکی
قزوین، ایران

رزاق محمودی

استادیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی،
دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اسغر محمد پور اصل

استادیار اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم
پزشکی قزوین، ایران

رزا زاوشی

دانشیار علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم
پزشکی قزوین، ایران

محمدرضا اسدی نداری

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،
دانشگاه تبریز، ایران

نویسنده مسئول: مصطفی نوروزی

پست الکترونیک: mnoroozi@ymail.com

تلفن: ۰۹۱۲۸۸۰۱۴۹۲

آدرس: مرکز تحقیقات رشد کودکان، دانشگاه علوم پزشکی
قزوین، ایران

دریافت: ۹۳/۱۰/۸

ویرایش پایانی: ۹۳/۱۰/۱۱

پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۳

آدرس مقاله

محمدپور کنزق ح، نوروزی م، محمودی ر، محمد پور اصل ا، زاوشی ر، اسدی نداری " اثر ضد میکروبی اسانس گیاه چای کوهی بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز " مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر ۹۴، دوره نهم (شماره ۲): شماره صفحه

مقدمه

لیستریا مونوسیژنوز باکتری گرم مثبت هوازی - بی هوازی اختیاری می باشد که در دمای صفر تا ۴۵ درجه، PH بین ۹/۶ تا ۴/۴، فعالیت آبی ۰/۸۳ و غلظت ۱۰ تا ۱۲/۵ درصد نمک طعام قادر به رشد بوده و می تواند در دمای یخچال نیز تکثیر یابد (۱). لیستریا مونوسیژنوز یک عامل بیمارزا می باشد که به وفور در طبیعت گسترش دارد و باعث مرگ ۳۰ درصد بیماران می شود (۲). این باکتری عامل ایجاد بیماری لیستریوز در انسان است که در افراد حساس (نوزادان، افراد مسن، زنان باردار و افراد دچار نقص ایمنی) موجب سیتی سمی، مننگوآنسفالیت، مننژیت و سقط جنین می شود (۳-۵). در افراد سالم مصرف مواد غذایی آلوده به این باکتری باعث تب، تهوع، اسهال و استفراغ می شود (۳،۴). در بسیاری از مواد غذایی خام و فرآوری شده مانند گوشت و فرآورده های گوشتی، شیر و فرآورده های لبنی، ماهی و غذاهای دریایی، میوه و سبزیجات یافت می شود (۳،۶). به طوری که مصرف غذا های آماده مصرف، خام و نیم پز، به دلیل آلودگی به لیستریا خطر بالقوه ای برای مصرف کننده محسوب می شود (۷). تاکنون چندین مورد شیوع این بیماری در مناطق مختلف به ویژه به دلیل مصرف مواد غذایی آلوده به این باکتری گزارش شده است (۸). اسانس ها و عصاره های حاصل از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی به عنوان گزینه ای مناسب جهت استفاده به عنوان نگهدارنده های سالم و طبیعی در مواد غذایی مطرح هستند (۹). اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری های بیماری زا به اثبات رسیده است (۱۰،۱۱). مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس ها به ترکیبات شیمیایی آن ها بستگی دارد و عموماً ناشی از تاثیر آن بر دیواره سلولی میکروب ها می باشد که موجب افزایش نفوذپذیری و مرگ سلول می شود (۱۲). ترکیبات شیمیایی اسانس ها با توجه به تنوع ژنتیکی گیاه، خاستگاه جغرافیایی، دوره رویش گیاه و عوامل محیطی ممکن است متفاوت باشد (۱۳). گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahl) از خانواده نعنائیان بوده

با ارتفاع حدود ۲۵ سانتی متر با ساقه کرکدار و گل های آبی متمایل به بنفش در بسیاری از مناطق ایران، ترکیه و عراق به صورت خودرو رشد می یابد (۱۴). این گیاه به صورت جوشانده برای درمان بیماری هایی مثل سردرد، اسهال و بیماری های گوارشی، التهاب زخم، اضطراب، سرفه، سرما خوردگی، دردهای عصبی، سنگ های مجاری ادراری و صفراوی، روماتیسم، سوء هاضمه، نفخ، عفونت پوست و تب در مناطق مختلف ایران توسط مردم مورد استفاده قرار می گیرد (۱۵). مطالعات صورت گرفته بر روی اسانس چای کوهی بیانگر قدرت ضد میکروبی بالای این اسانس بر باکتری های استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سالمونلا تیفی و اشریشیاکلی در محیط کشت است (۱۶). این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه چای کوهی بر باکتری لیستریا مونوسیژنوز انجام شده است.

روش بررسی

تهیه اسانس گیاه

گیاه چای کوهی را زمان گل دهی از دامنه های کوه سبلان اطراف شهرستان سرعین تهیه نموده، پس از تایید گونه و نام علمی در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره هرباریوم ۰۷۸۳)، در شرایط سایه خشک و بطور کامل خرد و آسیاب شد. با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger) ساخت کشور ایران، اسانس روغنی گیاه به روش تقطیر با آب استخراج شد.

تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه چای کوهی

آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) انجام شد. از دستگاه GC/MS۶۸۹۰ ساخت شرکت Agilent آمریکا با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتیگراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتیگراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتیگراد بود و

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)

حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration) با استفاده از داده های آزمایش MIC تعیین شد. بدین صورت که به پلیت های که حاوی محیط کشت Listeria Selective Agar (مرک آلمان) بودند، مقدار ۵ میکرولیتر از رقت تعیین شده برای MIC و چند رقت بالاتر از آن انتقال داده شد و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از مدت ۲۴ ساعت کم ترین غلظت اسانس که منجر به نابودی ۹۹/۹ درصد از باکتری شده بود به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی اسانس انتخاب شد (۱۹).

یافته ها

نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی اسانس چای کوهی توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی شامل نوع و درصد تشکیل دهنده اسانس مشخص شد (جدول ۱). ۱۶ نوع ترکیب شیمیایی در اسانس این گیاه وجود دارد و ترکیبات گاما-ترپین، میرسین، فنل و آلفا-پینن به ترتیب با ۲۸، ۱۸/۱۶، ۱۷/۸۷ و ۱۲/۷ درصد بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بودند. حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس چای کوهی برای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۶۰۰ ppm و ۲۴۰۰ ppm تعیین شد.

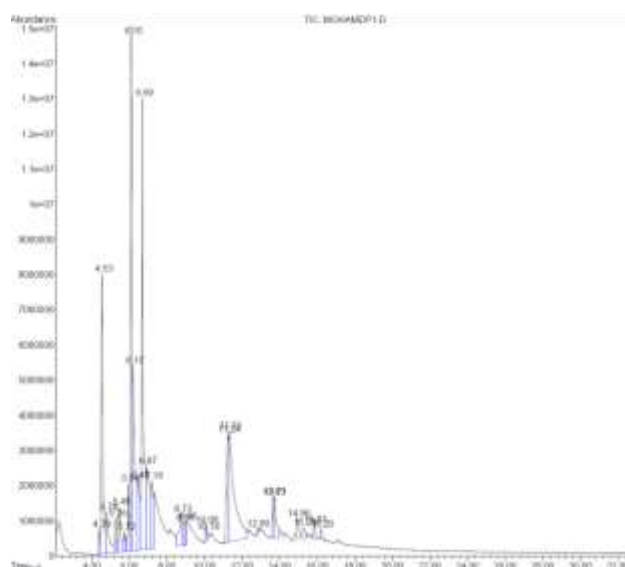
از گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی متر در دقیقه استفاده شد. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتیگراد استفاده شد. و در نهایت با استفاده از شاخص بازداری و طیف های جرم اجزای اسانس در مقایسه با طیف مرجع، ترکیبات اسانس شناسایی شد (۱۷).

ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC)

حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) اسانس چای کوهی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ATCC19118 انجام شد. باکتری به مدت ۱۲ ساعت در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (مرک آلمان) به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد. پس از تهیه رقت های متوالی از اسانس با استفاده از حلال دی متیل سولفوکساید، سپس داخل هر چاهک مقدار ۸۰ میکرولیتر محیط کشت آبگوشت BHI استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های متوالی اسانس و در نهایت ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی حاوی ۱۰^۵ cfu.ml از باکتری لیستریا مونوسیتوژنز اضافه شد. میکروپلیت ها را پس از هم زدن کامل با شیکر، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون حداقل رقت یا اولین چاهکی که در آن باکتری رشد نکرده بود و نسبت به گروه کنترل کدورت ایجاد نشده بود به عنوان مقدار MIC بر حسب ppm انتخاب شد (۱۸).

جدول ۱- نام و درصد ترکیب های شناسایی شده در اسانس چای کوهی

درصد	زمان	ترکیب
آشکارسازی (دقیقه)		
۰/۷۳	۴/۳۹	α -thujene
۱۲/۷	۴/۵۳	α -pinene
۱/۳۰	۵/۲۶	β -pinene
۱/۹۹	۵/۴۵	β -myrcene
۰/۶۳	۵/۷۲	l-phellandrene
۱/۹۳	۵/۹۴	α -terpinene
۱۷/۸۷	۶/۱۰	myrcene
۱۰/۸۰	۶/۱۷	benzaldehyde
۲۸	۶/۶۹	γ -terpinene
۰/۳۹	۱۰/۷	carvacrol methyl ether
۱۸/۱۶	۱۱/۲۴	phenol, 5-methyl-2-(1-methylethy)
۲/۸۳	۱۳/۶۴	trans-caryophyllene
۱/۰۵	۱۴/۹۶	germacrene-D
۰/۶۷	۱۸/۲۸	zingiberene
۰/۵۱	۱۵/۸۳	Δ -cadinene
۰/۴۴	۲۰/۱۶	cis- α -bisabolene



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس گیاه چای کوهی بدست آمده از دستگاه GC/MS

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد اسانس موجود در گیاه مورد مطالعه ۰/۱۲ درصد وزنی- وزنی است. بررسی مطالعات مشابه در این زمینه نشان می دهد که این درصد در گیاه چای کوهی مناطق مختلف ۰/۸، ۰/۳۰-۰/۳۵، ۰/۱۰-۰/۱۵، ۰/۲۵ درصد می باشد (۲۱، ۲۰، ۱۶، ۱۳). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گروه های مونوتروپنی و سزکویی تربنی ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس هستند و این نتیجه مطابق یافته های قاسمی و محمدی در شناسایی اسانس چای کوهی بومی استان اصفهان و چهارمحال بختیاری بود (۱۳). در مطالعه امیری و همکاران در بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه چای کوهی جمع آوری شده از ارتفاعات شهرستان خرم آباد، ۱۴ ترکیب در اسانس این گیاه شناسایی شد که ۹۰/۹۶ درصد کل اسانس را شامل می شد، در بین ترکیبات شناسایی شده آلفا-ترپنین (۲۰٪)، آلفا-پینن (۱۶/۳٪)، میرسین (۲۰/۹٪) و ژرماکرن (۸/۷٪) به عنوان ترکیبات اصلی شناسایی شدند (۱۶). در مطالعه فیض بخش و همکاران در اسانس چای کوهی منطقه آبعلی تهران ۴۴ نوع ترکیب شیمیایی شناسایی شد که ترکیبات آلفا-پینن (۲۰/۱٪)، بتا-پینن (۱۲/۱٪)، اسپاتونلول (۷/۲٪) و ژرماکرن-دی (۵/۳٪) اجزا اصلی تشکیل دهنده اسانس بودند (۲۲). در مطالعه تاجعلی بر روی ترکیبات شیمیایی

اسانس گیاه چای کوهی بومی استان مازندران و مرکزی مشخص شد که تعداد ترکیبات در نمونه های دو استان با هم متفاوت بوده به طوری که تعداد ترکیبات شناسایی شده در استان مرکزی ۵۴ ترکیب ولی در نمونه های مازندران ۴۳ ترکیب می باشد. آلفا-پینن (۲۲٪-۱۵/۷۸٪)، بتا-پینن (۷/۰۵٪-۳/۴۱٪)، سینئول (۲۲/۹۴٪-۱۴/۰۳٪) و کامفور (۴۲/۶۴٪-۶/۶۴٪) ترکیبات اصلی شناسایی شده در این اسانس بودند. همچنین تفاوت در ترکیبات مشاهده شده در دو اقلیم به خصوصیات اکولوژی دو منطقه نسبت داده شد و مشخص شد که نمونه های خاک این دو منطقه در مقدار فسفر و پتاسیم باهم اختلاف دارند که منجر به ایجاد تفاوت در ترکیبات اسانس گیاه چای کوهی رشد یافته در دو اقلیم شده است (۲۰). در مطالعه جاویدنیا و همکاران ۷۹ نوع ترکیب شیمیایی در گیاه چای کوهی بومی منطقه فشم تهران شناسایی شد که ترکیبات ژرماکرن-دی (۱۳/۲٪)، بتا-فلاندرین (۱۲/۷٪)، بتا-پینن (۱۰/۲٪)، میرسین (۹/۴٪) و آلفا-پینن (۸/۴٪) به عنوان مواد اصلی تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند (۲۱). در مطالعه Incan و همکاران نیز ۳۷ نوع ماده شیمیایی از گیاه چای کوهی بومی ترکیه یافت شد که ترکیبات بتا-فلاندرین (۲۷٪)، آلفا-پینن (۱۸/۵٪) و ژرماکرن-دی (۱۳٪) مواد اصلی تشکیل دهنده اسانس بودند (۲۳). پیر بلوطی و محمدی اسانس

چهارگونه مختلف از گیاه چای کوهی را که از اقلیم های اطراف اصفهان و چهارمحال بختیاری جمع آوری شده بود مورد بررسی قرار دادند، نتایج حاصل از مطالعه آن ها بیانگر اختلاف در ترکیبات گونه های مختلف این گیاه و همچنین در یک گونه پرورش یافته در اقلیم های متفاوت بود. ترکیبات اصلی اسانس، آلفا-توجون (۰/۳-۳۲/۳٪)، آلفا-پینن (۰/۳۷-۳۷٪-ناجیز)، میرسنین (۰/۵-۱۵/۹٪)، بتا-فلاندرین (۱/۱-۳۷/۹٪)، ژرمارکن-دی (۳/۱۱-۴٪) بودند (۱۳). مقایسه نتایج حاصل از این مطالعات نشان می دهد که اختلاف هایی در نوع و ترکیبات اسانس گیاه چای کوهی رشد یافته در مناطق مختلف وجود دارد. این اختلاف ها به عواملی مختلفی مثل تنوع ژنتیکی، عوامل محیطی بستگی دارد (۱۳ و ۲۴). اثرات ضد میکروبی اسانس ها وابسته به ویژگی های ترکیبات شیمیایی سازنده آن ها می باشد. با توجه به این که ترکیبات شیمیایی اسانس یک گیاه ممکن است با توجه به عوامل مختلفی نظیر شرایط جغرافیایی محل رشد و مرحله رشد گیاه، تغییر کند بنابراین ویژگی های ضد میکروبی آن نیز ممکن است متفاوت باشد. ترکیبات مونوترپنی و سزکویی ترپنی عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس چای کوهی در مطالعات مختلف می باشد. آلفا پینن به عنوان تنها ترکیبی است که به عنوان ترکیب اصلی در اسانس چای کوهی بومی مناطق مختلف شناسایی شده است، در مطالعه حاضر نیز جزیی از ترکیبات اصلی اسانس بود. بررسی مطالعات مختلف نشان می دهد که اسانس های گیاهی علیه میکروب ها دارای اثرات ممانعت کنندگی رشد و کشندگی هستند. در مطالعه امیری اثرات ضد میکروبی اسانس چای کوهی بر باکتری های سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتی کوس، کلبسیلا پنئومونیا، اشريشیاکلی، به ترتیب با قطر هاله بازدارندگی رشد ۳۱، ۲۹، ۲۱، ۲۱، ۲۲، ۲۵ میلی به اثبات رسید (۱۶). همچنین در مطالعه Iscan و همکاران حداقل غلظت ممانعت کنندگی

رشد اسانس چای کوهی برای میکرو ارگانیزم های و سالمونلا تیفی، سالمونلا تیفی موریوم و مخمر کاندیدا تروپیکاليس به ترتیب ۰/۳۷۵، ۰/۳۷۸ و ۰/۰۹۴ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد (۲۳). در مطالعه حاضر نیز این اسانس در غلظت ۲۴۰۰ ppm به طور کامل از رشد لیستریامونوسیتوژنز جلوگیری کرد. اثرات ضد لیستریایی سایر اسانس های گیاهی نیز بررسی شده است، به عنوان نمونه در مطالعه محمودی و همکاران مقادیر MBC اسانس های آویشن شیرازی، موسیر، بادیان رومی، نعناع و زیره سبز برای لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۳۰۰، ۲۴۰۰، ۲۴۰۰، ۴۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (۲۵). در مطالعه Mourey و همکاران آلفاپینن به عنوان ماده موثر ضد میکروبی اسانس برگ کاج علیه باکتری لیستریامونوسیتوژنز شناخته شد (۲۶). با توجه به اینکه آلفاپینن با ۱۲/۷۸ درصد به عنوان جزیی از ترکیبات اصلی اسانس است بنابراین اثر ضد لیستریایی اسانس را می توان به آن نسبت داد.

نتیجه گیری

گروه های مونوترپنی و سزکویی ترپنی عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس چای کوهی می باشد. همچنین اسانس این گیاه علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز دارای اثر ممانعت کنندگی رشد و باکتری کشی است بنابراین با جداسازی ماده موثره آن می توان به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها در درمان برخی از بیماری های مربوط به این باکتری و همچنین به صورت نگهدارنده های طبیعی در برخی از مواد غذایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت های مالی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قزوین به شماره قرارداد ۲۴/۲۱۵۶۴ د و تاریخ ۱۳۹۲/۱۲/۱۹ صورت گرفته است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده بهداشت تقدیر و تشکر می شود.

References

- Duché O, Trémoulet F, Glaser P, Labadie J. *Salt stress proteins induced in Listeria monocytogenes*. Applied and environmental microbiology. 2002; 68(4): 1491-1498.
- McLauchlin J, Mitchell R, Smerdon W, Jewell K. *Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods*. International Journal of Food Microbiology. 2004; 92(1): 15-33.
- Jay JM, loessner MG, Golden DA. *Modern food Microbiology*. 7th ed. Springer science and Business media; 2005. 591-917.
- Doganay M. *Listeriosis: clinical presentation*. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2003; 35(3): 173-175.
- Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive*. International Journal of Food Microbiology. 2007; 113(1): 1-15.
- Karunasagar I, Karunasagar I. *Listeria in tropical fish and fishery products*. International Journal of Food Microbiology. 2000; 62(3): 177-181.
- Rahimi E, Shakerian A. *Prevalence of Listeria Species in Ready-to-Eat Food in Shahrekord Restaurants*. Medical Laboratory Journal. 2014; 8(2): 83-87. [Persian]
- Adams MR, Moss Mo. *Bacterial Foodborn Diseases*. 2nd ed. England; 2002; 295-311.
- Bozin B M-DN, Simin N, Anackov G. *Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils*. Agric Food Chem. 2006; 8(54): 1822-1828.
- Saeedi S, Naeeni MM, Sabbagh SK, Bazi S. *Evaluation of antibacterial effects of Aqueous extracts of Achillea millefolium and Teucrium polium plants on ten human pathogenic bacteria*. Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2014; 21(4): 596-603.
- ShafaqiAsl K, Nooeizadeh E, Ghermi KAG, Maloofi N. *Comparison of Cinnamon and Turmeric aqueous and alcoholic extracts on Helicobacter Pylori in vitro*. Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2005; 12(3): 17-21.
- Burt S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review*. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-253. PMID: 15246235.
- Pirbalouti Ghasemi A, Mohammadi M. *Phytochemical composition of the essential oil of different populations of Stachys lavandulifolia Vahl*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2013; 3(2): 123-128. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60036-2.
- Ghahreman A. *Plant systematics : cormophytes of Iran*. 2nd ed. Tehran: Iran University Press.1994; 710-720.
- Zargari A. *Iranian Medicinal plants*. 3rd ed. Tehran: uninercity Publication.1982; 248-258.
- Amiri H, Roustaeian A, Lari YH, Haghiri C. *Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Stachys Lavandulifolia*. Iranian Journal of Sciences Islamic Azad University. 2009; 18(70): 43-50.
- Zargari A. *Handbook of Medical Plants*. 6th ed. Tehran University Publications. 1997; 145-154.
- Gulluce M, Sokmen M, Sahin F, Sokmen A, Adiguzel A, Ozer H. *Biological activities of the essential oil and methanolic extract of Micromeria fruticosa (L) Druce ssp. Serpyllifolia(Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004; 84(7): 735-741.
- Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. *Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains*. African Journal of Biotechnology. 2010; 9(27): 4251-4258.
- Tajali AA. *Influence of ecological factors on the chemical composition of the essential oil of Stachys lavandulifolia (Lamiaceae)*. Calodema. 2012; 228(4).
- Javidnia K, Mojab F, Mojahedi S. *Chemical constituents of the essential oil of Stachys lavandulifolia Vahl from Iran*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2003; 6(3): 174-178. DOI: 10.1080/0972-060X.2003.10643347.
- Feizbaksh A, Tehrani MS, Rustaiyan A, Masoudi S. *Composition of the Essential Oil of Stachys lavandulifolia Vahl. from Iran*. Journal of Essential Oil Research. 2003; 15(2): 72-73. DOI: 10.1080/10412905.2003.9712068.
- Işcan G, Demirci B, Demirci F, Göger F, Kirimer N, Köse Y, et al. *Antimicrobial and antioxidant activities of Stachys lavandulifolia subsp. lavandulifolia essential oil and its infusion*. Natural product communications. 2012; 7(9): 1241-1244. PMID:23074920.
- Ahmadi K, Sefidkon F, Assareh M. *The effects of different drying methods on essential oil content and composition of three genotypes of Rosa damascena Mill*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2008; 24(2): 162-176.
- Mahmoudi R, Ehsani A, tajik H, Pajohi, M. *Evaluation of phytochemical and antibacterial properties of some medicinal plants from Iran*. Journal of Biologically Active Products from nature. 2013; 3(5-6): 310-322.
- Mourey A, Canillac N. *Anti- Listeria Monocytogenes Activity of Essential Oils Components of Conifers*. Food Control. 2002;13(4):289-292. doi:10.1016/S0956-7135(02)00026-9.